

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ana Vrkić

7159/BT

UTJECAJ EKSTRAKTA IMELE NA PREŽIVLJAVANJE I
MORFOLOGIJU TUMORSKIH STANIČNIH LINIJA HeLa I HepG2

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Tehnologija vitamina i hormona

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Utjecaj ekstrakta imele na preživljavanje i morfologiju tumorskih staničnih linija
HeLa i HepG2**

Ana Vrkić, 0119022371

Sažetak: Testovima *in vitro* citotoksičnosti moguće je ispitati djelovanje novih spojeva, a dobiveni se rezultati mogu koristiti za planiranje budućih *in vivo* ispitivanja. Imela *Viscum album* je bogat izvor biološki aktivnih tvari, a od davnina se koristi u terapijske svrhe. U prethodnim je istraživanjima utvrđen antitumorski potencijal pripravaka imele, posebno u kombinaciji s klasičnim metodama liječenja karcinoma. U ovom istraživanju su korištene dvije tumorske stanične linije: HeLa i HepG2, te je određen biološki učinak ekstrakta imele pri različitim koncentracijama. Rezultati su izraženi kao vijabilnost stanica u odnosu na volumni udio ispitivanog ekstrakta imele, a promatrana je i promjena morfologije stanica. Ekstrakt imele je pokazao blagi inhibični učinak na rast i proliferaciju obje stanične linije, pri svim ispitivanim koncentracijama. Maksimum inhibicije rasta HeLa stanica bio je 24,55%, a HepG2 stanica 35,48%. Za daljnja je razmatranja antitumorskog djelovanja ekstrakta imele potrebno provesti ispitivanja na drugim staničnim linijama i po mogućnosti u kombinaciji s drugim metodama liječenja tumora.

Ključne riječi: citotoksičnost, ekstrakt imele, tumorska stanična linija, vijabilnost

Rad sadrži: 31 stranicu, 4 slike, 34 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček

Pomoć pri izradi: -

Datum obrane: rujan, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Bioengineering
Laboratory for Cell Technology and Biotransformation

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

The effect of mistletoe extract on survival and morphology of cancer cell lines
HeLa and HepG2

Ana Vrkić, 0119022371

Abstract: *In vitro* cytotoxicity assays are used to examine the biological effects of new compounds and to plan future *in vivo* experiments. Mistletoe *Viscum album* is a great source of biologically active substances, and has long been used for therapeutic purposes. Antitumor potential of mistletoe extracts has been confirmed in previous research, especially in combination with common cancer treatment. Two cancer cell lines: HeLa and HepG2, were used in this research for testing the biological effects of mistletoe extract at different concentrations. The results were expressed as cell viability relative to the volume fraction of the extract. Morphological changes were also observed. The mistletoe extract showed a slight inhibitory effect on growth and proliferation of both cell lines. Maximum growth inhibition of HeLa cells was 24,55%, and the one of HepG2 cells 35,48%. For further consideration of antitumor activity of the mistletoe extract it is necessary to perform studies with other cell lines and possibly in combination with other cancer treatment methods.

Keywords: cancer cell line, cytotoxicity, mistletoe extract, viability

Thesis contains: 31 pages, 4 figures, 34 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Višnja Gaurina Srček, Ph.D. Full Professor

Technical support and assistance: -

Defence date: September, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA	2
2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica	3
2.1.2. Dodaci mediju za uzgoj: serum	5
2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica	6
2.1.4. Primjena kulture stanica u testovima citotoksičnosti	8
2.2. FITOKEMIKA LIJE	9
2.2.1. Imela <i>Viscum album</i> i njen utjecaj na ljudsko zdravlje	10
2.2.2. Subkritična ekstrakcija vodom	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. HeLa i HepG2 stanične linije	14
3.1.1.1. HeLa stanična linija	14
3.1.1.2. HepG2 stanična linija	15
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Otopine i puferi	16
3.1.4. Uređaji i oprema	17
3.2. METODE RADA	17
3.2.1. Uzgoj HeLa i HepG2 stanica	17
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo	18
3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti subkritičnog vodenog ekstrakta iz listova imele na HeLa i HepG2 staničnim linijama	18

3.2.4. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom	19
3.2.5. Bojenje stanica bojom kristal violet	19
4. REZULTATI	20
4.1. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta imele na vijabilnost HeLa i HepG2 stanica	20
4.2. Morfološke promjene HeLa i HepG2 stanica nakon tretmana subkritičnim vodenim ekstraktom imele	22
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČCI	27
7. LITERATURA	28

1. UVOD

Biljke su jedan od najbogatijih izvora biološki aktivnih tvari, novih spojeva potencijalnog terapijskog djelovanja. Imela *Viscum album* se od davnina koristi za ublažavanje simptoma raznih bolesti, a višestruka istraživanja potvrđuju njeno antioksidacijsko i protuupalno djelovanje. Primjenu je našla i u liječenju zloćudnih tumora, a danas je najčešće korišteni biljni preparat kao dopuna klasičnim terapijama poput kemo- i radioterapije. Obzirom na njenu hemiparazitnu prirodu i odabir domaćina, iz njenih se listova mogu dobiti pripravci različitog sadržaja fitokemikalija.

Postupci dobivanja biljnih ekstrakata su raznoliki, a u novije se vrijeme teži ekološki prihvatljivim i visoko učinkovitim metodama. Zato je klasičnu primjenu raznih organskih otapala zamijenila subkritična ekstrakcija vodom. Voda je jeftino, dostupno i ekološki prihvatljivo otapalo čija se svojstva mogu značajno mijenjati manipulacijama temperature i tlaka, što rezultira otapanjem organskih spojeva različite polarnosti.

Primjena kultura životinjskih stanica ima niz prednosti. Neki od njih su visoka reproducibilnost rezultata, učinkovitija kontrola staničnog okoliša te manji broj pokusnih životinja. Posebno su zanimljive humane tumorske stanične linije koje se nerijetko koriste u *in vitro* testovima citotoksičnosti. Ova su ispitivanja brza i jeftina, a predstavljaju prvi korak u ispitivanju biološke aktivnosti novih spojeva. Iako su *in vivo* testovi neizbježni, *in vitro* eksperimenti omogućuju odabir spojeva potencijalnog biološkog djelovanja i odgovarajućih koncentracija istih.

U ovom je radu ispitan utjecaj subkritičnog vodenog ekstrakta iz listova imele na rast i proliferaciju dvije tumorske stanične linije, HeLa i HepG2. Kulture su tretirane različitim koncentracijama ekstrakta te je vijabilnost stanica određena MTS metodom. Praćene su i morfološke promjene stanica kojima su potkrijepljeni dobiveni rezultati.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. KULTURA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Kultura životinjskih stanica definirana je kao laboratorijska tehnika u kojoj stanice, prethodno izolirane iz višestaničnih životinjskih organizama ili tkiva, rastu u kontroliranim *in vitro* uvjetima. Tehnike kulture stanica su po mnogočemu slične tehnikama mikrobnih procesa. Ipak, u odnosu na bakterije i kvasce, životinjske su stanice mnogo osjetljivije i podložnije mehaničkim oštećenjima i kontaminaciji te zahtijevaju kompleksniji medij za uzgoj i odgovarajuće hranjive tvari za rast.

Primarne stanice su izolirane direktno iz životinjskih organa ili tkiva, obično su heterogene, imaju ograničen životni vijek odnosno ograničen broj generacija i niže vrijednosti specifične brzine rasta (Castilho i sur., 2008.). Primarnu kulturu, dakle, čine diferencirane stanice koje zadržavaju visokospecijalizirane funkcije tkiva iz kojeg su potekle te u *in vitro* uvjetima najbolje odražavaju svojstva *in vivo*. Subkultivacijom primarne kulture se uspostavlja konačna stanična linija, a već nakon nekoliko subkultivacija kultura postaje homogena ili barem uniformna. Nakon određenog broja generacija, konačna stanična linija odumire ili postaje kontinuirana (besmrtna) kao rezultat genotipskih promjena koje se postižu postupcima imortalizacije stanica. U tu svrhu se najčešće primjenjuje transfekcija viralnim genima ili transdukcija virusima. Bitna svojstva kontinuirane stanične linije su: promijenjena morfologija stanica, mogućnost adherentnog ili rasta u suspenziji, povećana brzina rasta, povećana učinkovitost kloniranja i neograničen životni vijek (Freshney, 2010.). Najveći nedostatak kontinuiranih staničnih linija je kromosomska nestabilnost i fenotipske promjene u odnosu na izvorno tkivo – stanice podliježu dediferencijaciji, degeneraciji ili transformaciji.

Prednosti kulture stanica u odnosu na mikrobnе procese su: bolja kontrola fizikalno-kemijskih uvjeta okoline poput pH, temperature, osmolalnosti i koncentracije otopljenih plinova, regulacija fiziološkog stanja stanica kontrolom koncentracije hormona i hranjivih tvari, homogenost kulture odnosno mogućnost korištenja istog tipa stanica što rezultira reproducibilnim i konzistentnim rezultatima, bolje razumijevanje staničnih procesa, manja količina reagensa i smanjenje broja pokusnih životinja (jeftinije i etički opravdano). S druge strane, početni troškovi ulaganja su visoki te tehnika zahtjeva iskusno i visokoobrazovano osoblje. Ostali nedostaci primjene kulture stanica su: promjene svojstava stanica tijekom dugotrajnog *in vitro* uzgoja, promjene biokemijskih mehanizama i enzimske aktivnosti kao posljedica promjene sastava hranjivog medija (nedostatak nutrijenata) ili nakupljanja određenih proizvoda metabolizma.

2.1.1. Medij za uzgoj životinjskih stanica

Stanice se uzgajaju u kemijski definiranom, vrlo složenom tekućem mediju čija je funkcija osiguravanje optimalnih uvjeta (pH i osmolalnosti) i dovoljne količine svih nutrijenata potrebnih za normalan rast, umnožavanje i održavanje stanica tijekom više generacija.

U početku se medij za uzgoj životinjskih stanica dobivao iz tkivnih ekstrakata i tjelesnih tekućina poput ekstrakta pilećeg embrija, plazme, seruma i limfe. Ovakvi su mediji bili iznimno skupi zbog kompleksnosti dobivanja i ograničenih izvora pojedinih komponenti, a točan sastav još uvijek nije bio poznat. Razvojem tehnologije porasla je potreba za kvalitetnijim i dostupnijim medijima za uzgoj. Zato se pristupilo analizi bioloških tekućina te su ubrzo razvijeni kemijski definirani hranjivi mediji koji su danas dostupni u raznim formulacijama. Najčešće korišteni mediji za uzgoj životinjskih stanica su BME (*Eagle's Basal Medium*, originalno oblikovan za rast mišjih L i HeLa stanica), EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*, poboljšani BME s većom količinom aminokiselina) te DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle's Medium*, modificirani BME koji ima četiri puta veću koncentraciju aminokiselina i vitamina). Razvijeni su i optimizirani mediji za uzgoj specifičnih staničnih linija kao što je RPMI-1640 koji se koristi za uzgoj staničnih kultura limfocita i hibridoma stanica, ali i oni koji omogućavaju manipulaciju pojedinih uvjeta uzgoja poput Leibovitz medija koji omogućava uzgoj fibroblasta bez potrebe za atmosferom obogaćenom CO₂ (Freshney, 2010.). Često se koristi mješavina hranjivih medija poput kombinacije Ham's S-12 i DMEM. Rezultat je iznimno učinkovit i univerzalan medij za primarne kulture, kao i za propagaciju staničnih linija.

Osnovne komponente hranjivog medija su voda, ugljikohidrati, aminokiseline, anorganske soli, vitamini, hormoni i faktori rasta te elementi u tragovima. Ponekad se dodaju i tzv. organski suplementi koji sadrže lipide (izvor i zaliha energije), organske kiseline, proteine i peptide, nukleozide i intermedijere TCA ciklusa.

Voda koja se koristi u pripremi medija za uzgoj životinjskih stanica ima vrlo visoke zahtjeve za čistoću. Mikroorganizmi, anorganski (teški metali, željezo, kloridi) i organski (detergenti) spojevi potencijalni su kontaminanti koji utječu na kvalitetu medija. Najčešće faze pročišćavanja koje se koriste za pripremu vode su deionizacija, mikrofiltracija i reverzna osmoza.

Od ugljikohidrata se najčešće dodaje glukoza koja stanicama služi kao izvor energije i ugljika. Uobičajeno se dodaje u koncentracijama 5-25 mM. Stanice glukozu uglavnom metaboliziraju u procesu glikolize uz formiranje piruvata. Piruvat ima dvije sudbine – pri anaerobnim

uvjetima se metabolizira do laktata, a pri aerobnim do acetil-CoA koji ulazi u ciklus limunske kiseline i podliježe potpunoj oksidaciji do CO_2 i H_2O . U kulturi životinjskih stanica je opažena povećana koncentracija laktata u mediju što upućuje na to da TCA ciklus ne funkcionira jednako u *in vivo* i *in vitro* uvjetima. Visoke koncentracije laktata uzrokuju zakiseljavanje medija te inhibiraju rast stanica.

U hranjivi se medij uvijek dodaju esencijalne (arginin, cistein, glutamin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, tirozin i valin), a ovisno o potrebama stanične linije, i neesencijalne aminokiseline. One su u mediju prisutne u koncentracijama 0,1-0,2 mM i prekursori su u sintezi proteina. Dodaju se u obliku smjese točno definiranog sastava, a često i kao proteinski hidrolizati sirutke, soje ili pšenice. Glutamin se u medij dodaje u višim koncentracijama (2-4 mM) u odnosu na ostale aminokiseline jer, osim u sintezi proteina, ima funkciju kao preteča za intermedijere TCA ciklusa. No, metaboličkom i/ili toplinskom razgradnjom glutamina nastaje amonijak koji ima jako inhibitorno djelovanje (Butler i Christie, 1994.). Zato se kao alternativa dodaje Glutamax – L-alanil-L-glutamin dipeptid u otopini NaCl. Glutamax je stabilan u širokom temperaturnom rasponu, a u stanici ne dolazi do njegovog spontanog raspada i formiranja amonijaka. Umjesto toga, stanica ga koristi po potrebi, cijepanjem peptidne veze (djelovanjem peptidaza) čime se oslobađa L-glutamin.

U medij se uobičajeno dodaju ioni anorganskih soli: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^- , čija je funkcija održavanje ionske ravnoteže i osmotskog tlaka u mediju za uzgoj, a neizostavna je i njihova uloga kao koenzima u enzimskim reakcijama. Na^+ , K^+ , Cl^- imaju ulogu u regulaciji membranskog potencijala, dok SO_4^{2-} , PO_4^{3-} i HCO_3^- sudjeluju u sintezi makromolekula i reguliraju unutarstanični naboj. Bikarbonat ima glavnu ulogu u puferiranju medija zajedno s plinovitim CO_2 koji se nalazi u atmosferi inkubatora. Iako potrebni, Mg^{2+} i Ca^{2+} se dodaju u manjim koncentracijama kako bi se spriječila agregacija stanica (Freshney, 2010.).

Vitamini, hormoni i faktori rasta su esencijalni za normalno funkcioniranje organizma i održavanje homeostaze. Od vitamina se mediju za uzgoj najčešće dodaju vitamini B skupine poput biotina i folne kiseline, dok su ostali osigurani dodatkom seruma. Potrebni su u vrlo malim koncentracijama (μmol), a koriste se kao metabolički kofaktori. Od hormona se dodaju inzulin, hidrokortizon, trijodtironin te steroidni hormoni. Općenito je sadržaj vitamina i hormona definiran vrstom medija odnosno potrebama stanične linije, a povećan je kod nižih koncentracija seruma. Faktori rasta su obično male proteinske molekule, visoko specifične s obzirom na vrstu stanica, koje stimuliraju specifične stanične funkcije, povećavaju proliferaciju i potiču diferencijaciju stanica. Dodaju se u malim količinama, a najbitniji su EGF

(*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), TGF (*transforming growth factor*), IGF-1 i IGF-2 (*insulin-like growth factors*) te PDGF (*platelet-derived growth factor*) kojima je zajedničko mitogeno djelovanje.

Od elemenata u tragovima (Mn, Cu, Fe, Zn, Si, Ni,...), treba istaknuti važnu strukturnu, katalitičku i antioksidacijsku ulogu selena. Većina je elemenata u tragovima važna za aktivnost enzima i preživljavanje stanica, a potrebni su u vrlo malim koncentracijama.

2.1.2. Dodaci mediju za uzgoj: serum

Serum je bezstanična krvna komponenta koja se dobiva zgrušavanjem krvi životinjskog podrijetla, a čija je glavna funkcija u kulturi stanica stimulacija rasta i drugih staničnih aktivnosti. Obično se mediju dodaje u rasponu koncentracija 5-10% (vol/vol), a izvor je aminokiselina, peptida i proteina, faktora rasta, hormona, vitamina, minerala, lipida i mnogih drugih komponenti nužnih za proliferaciju stanica. Serum može sadržavati i sastojke koji mogu usporiti ili inhibirati rast stanica. Najčešće korišteni su fetalni goveđi serum, goveđi, konjski i teleći serum.

Fetalni goveđi serum (FBS – *Fetal Bovine Serum* ili FCS – *Fetal Calf Serum*) karakterizira visok udio embrionalnih faktora rasta i nizak udio imunoglobulina, što ga često čini prvim izborom u radu s kulturama životinjskih stanica. Korištenje seruma je kontroverzno jer njegova proizvodnja uzrokuje nepotrebnu patnju životinja. Proizvodni proces ima vrlo nizak prinos pa je konačna cijena proizvoda iznimno visoka. Osim toga, kemijski sastav seruma nije u potpunosti definiran pa je nepoznat utjecaj pojedinih komponenti na kulturu stanica. Vrlo česta su i odstupanja od kemijskog sastava između šarži što može rezultirati nedosljednošću rezultata uslijed fenotipskih promjena stanica. Serum je nerijetko izvor kontaminanata (poseban problem su virusi, prioni i mikoplazme) i različitih endotoksina pa je potrebno provesti metode inaktivacije istih, što naravno povećava (već visoku) cijenu priprema. Navedeni se problemi mogu izbjeći upotrebom tzv. *serum-free* medija. Postoji više načina pripreme takvog tipa medija, a svi se temelje na karakterizaciji komponenti (seruma) ključnih za adheziju, rast i proliferaciju stanica. *Serum-free* mediji su selektivni za određeni tip stanica te se sastav medija može standardizirati. Na taj se način osigurava dosljednost rezultata istraživanja te se promjenom koncentracije pojedinih sastojaka može utjecati na stanične funkcije. Mediji bez seruma su vrlo kompleksni – primjer je M199 koji sadrži čak 61 komponentu – te još uvijek postoje problemi vezani uz njihovo korištenje poput sporije proliferacije, niže maksimalne koncentracije i nižeg broja generacija stanica.

2.1.3. Uvjeti uzgoja životinjskih stanica

Uspješnost rasta životinjskih stanica u *in vitro* uvjetima ovisi o nekoliko faktora kao što su pH, temperatura, osmolalnost, koncentracija plinova (O_2 i CO_2), dostupnost supstrata i fiziološko stanje stanica u inokulumu. Cilj uzgoja *in vitro* je postići uvjete okoline kakvima su stanice bile izložene u organizmu odnosno tkivu, tj. imitirati *in vivo* uvjete (Castilho i sur., 2008.).

Temperatura vođenja procesa ovisi o vrsti i porijeklu stanica, ali i o željenom proizvodu procesa. Optimalna temperatura za uzgoj kulture stanica sisavaca je 35-37°C. Niže temperature će usporiti rast kulture, ali ne bi trebalo doći do oštećenja stanica. S druge strane, povišenje temperature na 39-40°C je za većinu kultura letalno. Upravo zbog opasnosti od pregrijavanja kulture, inkubator se podešava na malo nižu temperaturu od optimalne. Potrebno je osigurati uniformnost temperature te slobodnu cirkulaciju zraka u inkubatoru. Temperatura utječe i na topljivost komponenti hranjivog medija, posebice plinova CO_2 i O_2 .

Kisik je često limitirajući faktor procesa zbog slabe topljivosti u vodi i vodenim otopinama, a mnogi sastojci podloge, poput soli i glukoze, dodatno smanjuju njegovu topljivost u mediju za uzgoj. Na topljivost kisika bitno utječu i temperatura te parcijalni tlak kisika u plinskoj fazi. Povećanjem temperature se smanjuje, a povećanjem parcijalnog tlaka kisika se povećava njegova topljivost. Održavanje kisika u dovoljnim količinama za normalan rast i proliferaciju stanične kulture iznimno je bitan i zahtjevan zadatak, kako u laboratoriju tako i u velikom mjerilu, bioreaktoru. Za većinu je kultura stanica dovoljan atmosferski kisik, dok je za kulture tkiva potrebno osigurati kontroliranu atmosferu 95% O_2 .

pH vrijednost pri kojoj većina staničnih linija sisavaca raste i uspješno se razmnožava je 7,4. Kao indikator se najčešće koristi fenol crveno koji je osjetljiv na vrlo male promjene pH pa je tako pri pH 7,8 – 7,4 karakteristične crvenkaste (ružičaste) boje, dok je pri nižim pH vrijednostima narančaste (7,0) ili žute (6,5) boje što ukazuje na kontaminaciju. Problem predstavljaju nečistoće prisutne u samom indikatoru koje mogu utjecati na ponašanje stanica. pH kulture se održava puferskim sustavom hidrogenkarbonat- CO_2 te se na ovaj način imitira regulacija pH *in vivo*. U inkubatorima se najčešće održava atmosfera od 5% CO_2 (parcijalni tlak CO_2 = 40 mmHg) koja je u ravnoteži s koncentracijom hidrogenkarbonata u mediju (obično 24 mM).

Stanični metabolizam proizvodnjom laktata i amonijaka također utječe na pH kulture.

U nekim je slučajevima potreban sustav s većim puferским kapacitetom te se u tu svrhu koriste organski puferi. Jedan od najčešće korištenih je Hepes (N-(2-hidroksietil)piperazin-N'-2-(etansulfonska kiselina)) uz čiju primjenu nema potrebe za kontroliranom atmosferom CO₂ (Castilho i sur., 2008.).

Osmolalnost je koncentracija otopine izražena kao ukupni broj otopljenih čestica odnosno osmotski aktivnih čestica po kilogramu otapala. Većina staničnih linija dobro tolerira promjene osmotskog tlaka. Optimalna osmolalnost medija za uzgoj većine stanica sisavaca je 260-320 mOsm/kg, ali tijekom uzgoja ne bi trebala odstupati više od ± 10 mOsm/kg.

Kao problem se može javiti blago isparavanje otapala (vode) tijekom inkubacije kultura uzgajanih u Petrijevim zdjelicama ili *multiwell* pločama. Posljedica je povećana osmolalnost medija koja negativno utječe na rast i proliferaciju stanica pa je poželjno kulturu održavati u blago hipotoničnom mediju.

Kod rada s kulturom stanica nužno je održavati aseptične uvjete zbog visoke osjetljivosti stanica na kontaminante poput bakterija, kvasaca i plijesni. Kontaminacija se očituje u naglom padu pH vrijednosti ili zamućenju medija. Mogućnost kontaminacije mikroorganizmima je vrlo visoka zbog njihovih kratkih generacijskih vremena i mogućnosti korištenja raznih supstrata za rast i razmnožavanje. Tako je na primjer generacijsko vrijeme bakterija otprilike 30 minuta, dok je ono u većine stanica sisavaca oko 24 sata. Zato prilikom rada s kulturom stanica treba primijeniti sljedeće korake:

- pranje ruku antiseptičkim sapunom prije i nakon rukovanja stanicama; poželjno je koristiti jednokratne gumene rukavice
- ograničiti pristup laboratoriju tijekom izvođenja eksperimenata
- dekontaminirati radnu površinu prije i nakon svakog postupka sa stanicama; prebrisati 70% alkoholom i uključiti UV svjetlo
- sve manipulacije stanicama izvoditi u sterilnom prostoru (laminaru) i koristiti isključivo sterilno posuđe i pribor
- hranjivi medij i serum dobavljati od provjerenog dobavljača

U cilju prevencije razvoja bakterija u hranjivi se medij mogu dodati i antibiotici (penicilin i streptomycin). Problem se javlja ako se kontaminacija samo maskira, a ne ukloni. Dobre aseptične tehnike rada eliminiraju potrebu za dodatkom antibiotika (Butler, 2004.). Osim toga, na mnoge kontaminante antibiotici ne djeluju. Primjer su mikoplazme, jednostavni prokarioti prisutni u stanicama sisavaca koji se mogu naći u animalnom serumu.

2.1.4. Primjena kulture životinjskih stanica u testovima citotoksičnosti

Kultura životinjskih stanica je osnova tzv. crvene biotehnologije čija uloga u domeni ljudskog zdravlja konstantno raste. Osim proizvoda stanica poput virusnih cjepiva i rekombinantnih terapijskih proteina, same stanice su vrlo bitan proizvod tehnologije, posebno u području regenerativne medicine (tkivno inženjerstvo) i *in vitro* testovima toksičnosti novih spojeva.

In vitro testovi citotoksičnosti uključuju ispitivanja na staničnim frakcijama, primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, dijelovima tkiva ili kulturama organa (Kniewald i sur. 2005.). Primjenjuju se u procjeni sigurnosti proizvoda prije odobrenja za uporabu i stavljanja na tržište, poput farmaceutika, kozmetike, prehrambenih aditiva i pesticida. Primjenu pronalaze i u ispitivanjima potencijalnog citostatskog odnosno antineoplastičnog djelovanja novih spojeva tj. lijekova u razvojnoj, pretkliničkoj fazi. U tu svrhu se najčešće koriste humane tumorske stanične linije (Radojčić Redovniković i sur., 2016.) koje su dostupne putem banka stanica kao što su *American Type Cell Culture* (ATCC) i *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC). Primarni *in vitro* test Nacionalnog instituta za rak (NCI, *National Cancer Institute*) iz 1990. uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje djelovanja raznih komponenti u definiranim rasponima koncentracija, kako bi se utvrdio stupanj inhibicije rasta ili tzv. bazalne citotoksičnosti spoja za svaku staničnu liniju (Boyd i Paul, 1995.).

Vrlo je bitno da se svako *in vitro* mjerenje može interpretirati na razini *in vivo* odgovora u istim ili sličnim stanicama, a minimalni zahtjev je razumijevanje i objašnjenje mogućih razlika između rezultata dobivenih dvama testovima. Mjerenje toksičnosti *in vitro* je stanični događaj. Sustavom koji je jednostavniji od čitavog organizma postiže se dobra reproducibilnost rezultata, ali je vrlo teško, na staničnoj razini, opisati farmakokinetiku ispitivane tvari odnosno njeno kretanje kroz organizam, od apsorpcije do eliminacije. Osim toga, razumijevanje metabolizma ispitivanog spoja je bitno i zbog moguće promjene njegova djelovanja. Mora se utvrditi da ispitivani spoj do *in vitro* i *in vivo* stanica dolazi u istom aktivnom obliku (Freshney, 2010.). Zato su u mnogo slučajeva testovi na životinjama neizbježni. Ipak, značajan je doprinos *in vitro* testova citotoksičnosti u planiranju *in vivo* eksperimenata, u smislu odabira vrste spoja i odgovarajuće doze za testiranje na životinjama.

2.2. FITOKEMIKA LIJE

Kemijski vrlo raznolike, biološki aktivne tvari su prirodno prisutne u hrani, a karakteriziraju ih razni biološki učinci na organizam, kako povoljni tako i nepovoljni. Jedan od najvećih izvora biološki aktivnih tvari su upravo biljke koje sintetiziraju brojne fitokemikalije. Fitokemikalije su nehranjive biljne komponente (neesencijalni nutrijenti) koje imaju ulogu u prevenciji bolesti i/ili zaštiti biljke od predatora i patogena. Fiziološki gledano to su produkti sekundarnog metabolizma te biljkama nisu potrebni za rast i razmnožavanje. Posebno su zanimljivi polifenolni spojevi. Po strukturi su to aromatski spojevi s više hidroksilnih supstituenata, a dijele se u skupinu flavonoida (flavonoli, flavoni, izoflavoni, antocijanidini,...) i ne-flavonoida (fenolna kiselina, stilbeni, lignani) (Pandey i Rizvi, 2009.). Flavonoidi imaju značajan biološki učinak u ljudskom tijelu. U tom smislu im se pripisuju protuupalna, antimikrobna i antivirusna svojstva, a utvrđena je kardio- i neuro- protektivna uloga (Radojčić Redovniković i sur., 2016.).

Posebno je važna antioksidacijska aktivnost polifenolnih spojeva koja rezultira smanjenjem oksidativnog stresa. Oksidativni stres je stanje organizma u kojem dolazi do povećanog stvaranja izuzetno reaktivnih, slobodnih kisikovih čestica (O^-), koje nazivamo „reaktivne kisikove vrste“ ili skraćeno ROS (eng. *Reactive Oxygen Species*). ROS su prirodni nusprodukti metabolizma kisika koji imaju ulogu u staničnoj signalizaciji i održavanju homeostaze, no u povećanim koncentracijama doprinose mutagenezi putem destabilizacije membrana i oštećenja DNA, što posljedično može rezultirati formiranjem tumora (Radojčić Redovniković i sur., 2016.). Fenolne grupe u polifenolima mogu akceptirati elektrone te formirati relativno stabilne fenoksil radikale. Rezultat je prekid lančane reakcije oksidacije i smanjenje oksidativnog stresa (Pandey i Rizvi, 2009.).

Od fitokemikalija nepovoljnog odnosno potencijalno toksičnog djelovanja, treba istaknuti biljne lektine. Lektini su glikoproteini, a karakterizira ih sposobnost aglutiniranja stanica. Sadrže minimalno jednu ne-katalitičku domenu koja im omogućuje reverzibilno i visoko specifično vezanje na mono- i oligosaharide (Lam i Ng, 2011.). Lektini su strukturno vrlo raznoliki – variraju u molekulskoj masi, aminokiselinskom sastavu, metalnim kofaktorima i trodimenzionalnoj strukturi. Predstavljaju i modelni sustav za proučavanje interakcija proteina i ugljikohidrata. Osim toga, njihova im priroda omogućava lako izdvajanje i pročišćavanje upotrebom afinitetne kromatografije s odgovarajućim imobiliziranim ugljikohidratima (Liener, 1986.). Mnogi biljni lektini imaju citotoksični i imunomodulatorni učinak u životinjskim stanicama. Upravo u toj dvojakoj funkciji leži njihovo potencijalno antitumorsko djelovanje.

2.2.1. Imela *Viscum album* i njen utjecaj na ljudsko zdravlje

Imela *Viscum album* je višegodišnja, zimzelena, grmolika biljka iz porodice *Viscaceae*. Postoje mnoge vrste imele, ali samo je *Viscum album* karakteristična za europsko podneblje. Imela raste kao poluparazit na listopadnom drveću poput hrasta, brijesta i jabuke i crnogoričnim vrstama poput bora, gdje pomoću haustorija (posebnih sisaljki) crpi hranjive tvari. Grm može narasti do promjera 150 cm. Listovi su nasuprotni, sjedeći, duguljasti i objajasti, voštani (kožnati) i zelene boje te duljine 2-10 cm. Cvjetovi su sjedeći, neugledni, mali (do 2 mm u promjeru) i žuto-zelene boje te je prisutan paštitiasti ili cimozni cvat. Plod je bobica bijele boje te sadrži samo jednu sjemenku koju uglavnom rasprostranjuju ptice (Zuber, 2004.).



Slika 1. Biljka *Viscum album* ili bijela imela

Imela se kao farmaceutik koristi već dugi niz godina, kako u tradicionalnoj tako i u modernoj medicini. Neki od prvih zapisa o terapijskom djelovanju imele potječu iz antičkog doba. Tako je na primjer Pedanius Dioscorides, grčki ljekar i botaničar, opisao *Ixos* (pripravak imele *V. album*) i njegovu uporabu u liječenju čira na želucu, uklanjanju gnoja te ublažavanju otekline (Lev i sur., 2011.).

Imela sadrži brojne fitokemikalije koje su se pokazale efikasne u liječenju humanih tumora. Osim antitumorskog djelovanja, uočeni su i antidijabetički, vazodilatacijski, protuupalni, antiepileptički, antipsihotički i mnogi drugi učinci imele. Njeni se ekstrakti nerijetko koriste u kombinaciji s kemoterapijom.

Polifenolni spojevi prisutni u ekstraktima imele mogu inhibirati oksidativno oštećenje, mutagenezu i karcinogenezu uzrokovanu uporabom antineoplastičnih lijekova pri liječenju karcinoma. Pojedini flavonoidi poput kvercetina pojačavaju citotoksični učinak kemoterapeutskih lijekova tako što povećavaju osjetljivost tumorskih i otpornost normalnih, zdravih stanica susjednog tkiva (Brito i sur., 2015.).

Fitokemikalije, specifične za imelu, koje imaju jako biološko djelovanje su, osim polifenolnih spojeva, lektini i viskotoksini. Poseban se značaj pripisuje kvantitativno najzastupljenijem lektinu imele, VAA-1 (*Viscum album* aglutinin 1). VAA-1 je tzv. galaktozidno-specifični lektin, proteinska molekula koja se sastoji od 2 polipeptidna lanca međusobno povezana disulfidnim mostom. A-lanac je zaslužan za citotoksično djelovanje odnosno za inaktivaciju ribosoma. B-lancu se pripisuje funkcija specifičnog vezanja ugljikohidrata (na staničnoj membrani) i unošenje molekule lektina u stanicu od interesa odnosno imunomodulatorno djelovanje lektina (Hajtó i sur., 2005.). Lektini imele (VAA-1, VAA-2, VAA-3) imaju dvojako djelovanje, direktno i indirektno. Direktno se djelovanje odnosi na inhibiciju sinteze proteina i posljedično apoptozu stanice u koju se unesu, dok je indirektno djelovanje vezano uz stimulaciju imunoloških procesa što se očituje u povećanom broju NK (*natural killer*) i TH (*T helper*) stanica (Bar-Sela, 2011.).

Viskotoksini su nisko molekularni, jako bazični polipeptidi građeni od 46 aminokiselinskih ostataka, imaju visok sadržaj cisteina te tri disulfidna mosta. Viskotoksini također imaju jako imunogeno, ali i citotoksično djelovanje. Tijekom citotoksičnog djelovanja viskotoksina dolazi do ubrzane lize stanične membrane (ne inducira se apoptoza stanice) (Bar-Sela, 2011.). Opisano je 6 izoformi (A1, A2, A3, B, 1-PS i U-PS), a najzastupljeniji je viskotoksin A3 koji pokazuje i najveću citotoksičnost (Schaller i sur., 1996.).

2.2.2. Subkritična ekstrakcija vodom

Biljni lijekovi, koji se pretežno temelje na ekstrakciji biološki aktivnih spojeva iz biljaka, trenutno čine 30-40% tržišno prisutnih farmaceutskih proizvoda. Prvi korak u razvoju takvog pripravka je ekstrakcija i separacija biološki aktivnih spojeva – potencijalnih farmaceutika – iz biljnog materijala. U tu svrhu su razvijene i standardizirane metode poput destilacije vodenom parom, ekstrakcije otapalom i sublimacije. Česta je primjena jednog ili više organskih otapala (ekstrakcija) u kombinaciji s daljnjim procesima pročišćavanja. Točnije, ovako dobiveni pripravci se moraju dodatno obraditi u cilju uklanjanja ostataka otapala i zaostalih nečistoća, a tek onda slijedi separacija i pročišćavanje pojedinih fitokemikalija (Liang i Fan, 2013.).

Osnovni problemi primjene ovakvih konvencionalnih metoda su nedovoljna čistoća kemikalija, teško uklanjanje ostataka otapala korištenih za ekstrakciju te skupoća proizvodnje većih količina. Osim toga, za ekstrakciju je potrebno odabrati tip i koncentraciju otapala tako da se izbjegnu strukturalne promjene tvari od interesa te da se osigura dovoljna učinkovitost procesa uz minimalne količine otpadnih kemikalija.

Posljednjih su godina u razvoju nove tehnologije i metode za pripremu biljnih ekstrakata kao što su ultrazvučna ekstrakcija, membranske tehnologije izdvajanja, mikrovalna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim CO₂ te subkritična ekstrakcija vodom.

Voda je jeftino i ekološki prihvatljivo otapalo čija se svojstva mogu značajno mijenjati promjenama tlaka i temperature (Rovio i sur., 1999.). Tako voda ostaje u tekućem stanju, čak i pri temperaturama znatno višim od njenog vrelišta (100°C pri atmosferskom tlaku). Polarnost, viskoznost, površinska napetost i konstanta disocijacije su sniženi u odnosu na vodu pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku, što značajno približava kemijska svojstva vode onima koja imaju organska otapala. Stlačena voda niske polarnosti pri subkritičnim uvjetima efikasno otapa polarne (pri nižim temperaturama) i nepolarne (pri višim temperaturama) organske molekule. Subkritična voda se može održavati u tekućem obliku do temperature 374°C pri tlaku 221 bar te se ovi uvjeti mogu mijenjati u ovisnosti o organskom spoju kojeg želimo izdvojiti. Osim toga, pri ovako visokim vrijednostima temperature i tlaka povećana je i brzina difuzije pa je ekstrakcija subkritičnom vodom istovremeno selektivna i brza (Liang i Fan, 2013.).

Subkritična voda je ekološki prihvatljiva kao otapalo i lakše ju je odlagati i skladištiti nego uobičajeno korištena organska otapala za ekstrakciju. Vremenski je ekstrakcija subkritičnom vodom brža i manje opasna po korisnika od korištenja uobičajenih, potencijalno toksičnih, organskih otapala. Pogodna je za izdvajanje polarnih i nepolarnih biološki aktivnih spojeva

(poput fitokemikalija), manje ili veće molekulske mase. Trenutno se ovakva ekstrakcija primjenjuje za pročišćavanje esencijalnih ulja, tanina, flavonoida, glikozida, proteina, pektina, laktona i organskih kiselina. Ipak, ako je cilj razdijeliti i pročistiti pojedine aktivne sastojke iz biljaka, koji mogu biti i često jesu međusobno vrlo slični, sama ekstrakcija subkritičnom vodom neće biti dovoljna za postizanje zahtjeva čistoće. Zato je potrebno primijeniti tehnike pročišćavanja poput membranske separacije, molekularne destilacije ili adsorpcije (Liang i Fan, 2013.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. HeLa i HepG2 stanične linije

U ovom su istraživanju korištene humane stanične linije HeLa i HepG2, dobivene iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica. Morfološki su to epitelne, a prema načinu uzgoja adherentne stanice. Uzgoj staničnih linija se provodi u T-bocama ravnih stijenki te u pločama s jažicama, u inkubatoru s 95% zraka i 5% CO₂ pri temperaturi 37°C. Za uzgoj je korišten DMEM hranjivi medij uz dodatak 10% FBS.

3.1.1.1. HeLa stanična linija

HeLa je prva humana stanična linija uspostavljena u kulturi i do danas najčešće korištena u brojnim istraživanjima. Kulturu je 1951. godine uspostavio stanični biolog George Gey u bolnici Johns Hopkins (Baltimore) u cilju istraživanja i efikasnijeg liječenja tumora. Stanice su uzete iz raka vrata maternice tridesetjednogodišnje pacijentice Henriette Lacks, koja je umrla kasnije te godine. Uzrok tumora bio je humani papiloma virus 18 (HPV 18), što je dokazano metodom *in situ* hibridizacije kromosoma pri čemu je utvrđeno više mjesta integracije virusne DNA (Popescu i sur., 1987.).

HeLa stanice su besmrtni i dijele se otprilike svaka 23 sata. Karakterizira ih i visoka stabilnost genoma odnosno ne pokazuju značajnije genetičke modifikacije tijekom rasta kroz veći broj generacija. Od drugih ih humanih staničnih linija razlikuje iznimna izdržljivost i prilagodljivost različitim uvjetima, ali su osjetljive na promjene temperature. Zbog nepravilnog su održavanja česti kontaminanti ostalih laboratorijskih kultura (Gartler, 1968.). Kariotip HeLa stanične linije (soj CCL2) određen je kombinacijom metoda komparativne genomske hibridizacije (CGH), fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) i spektralne kariotipizacije (SKY) (Macville i sur., 1999.), pri čemu je utvrđena hipertriploidija kulture (76-80 kromosoma).

Jedna od najranijih primjena HeLa stanica bila je u razvoju cjepiva protiv polio virusa (Scherer i sur., 1953.), a s vremenom su postale i 'modelni sustav' u istraživanjima mehanizama virusnih infekcija. One su također prve stanice uspješno klonirane te je pomoću njih usavršen uzgoj kultura stanica i tkiva.

Često su prvi izbor u ispitivanjima toksičnosti, ali i potencijalnog antitumorskog djelovanja novih spojeva.

3.1.1.2. HepG2 stanična linija

HepG2 je humana besmrtna stanična linija uspostavljena iz stanica epitelnog tkiva hepatocelularnog karcinoma (tumora jetre) petnaestogodišnjeg dječaka. Broj kromosoma u stanici se kreće od 50 do 60 (uglavnom 55). HepG2 stanice luče brojne proteine plazme poput transferina, fibrinogena, plazminogena i albumina, što je svojstvo zdravih hepatocita. Stanice su adherentne, rastu u monosloju i nakupljaju se u manje aggregate, a rast se može stimulirati humanim hormonom rasta. Uspješno su uzgajane i u *large-scale* sustavima.

HepG2 stanična linija se redovito primjenjuje kao *in vitro* model hepatocita te služi u ispitivanjima toksičnosti spojeva (Dehn i sur., 2004.). Jetra je ključni metabolički organ pa se HepG2 stanice koriste za proučavanje metabolizma brojnih tvari, posebno lijekova. HepG2 je prva humana, tumorska stanična linija jetre koja je zamijenila 'zlatni standard' modela za ispitivanja metabolizma ksenobiotika i citotoksičnosti tvari – humane hepatocite. Iako primarne kulture humanih hepatocita najbolje odražavaju *in vivo* sustav (jetru), njihova je primjena problematična zbog oskudnih količina odnosno nedostupnosti materijala (svježi uzorci jetre), komplicirane izolacije, ograničenog životnog vijeka te varijabilnosti jedinki unutar kulture (Gerets i sur., 2012.).

Slično kao i HeLa, HepG2 stanična linija je svoju primjenu našla kao prvi korak u ispitivanjima spojeva potencijalnog antitumorskog djelovanja, a jedan od brojnih primjera su flavonoidi koji uzrokuju apoptozu u staničnoj liniji (Batra i Sharma, 2013.).

3.1.2. Kemikalije

0,25% Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, UK

Etanol, p.a., Kemika, Zagreb, RH

Fetalni teleći serum (FBS), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Kristal violet, Kemika, Zagreb, RH

MTS reagens ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijevazol)), Promega, SAD

Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

Subkritični vodeni ekstrakt iz listova imele, Tehnološki fakultet, Sveučilište Novi Sad

3.1.3. Otopine i puferi

PBS pufer (pH= 7,4):

Natrijev klorid	8,0 g
Kalijev klorid	0,2 g
Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
Destilirana voda	do 100 mL

0,4% otopina tripan-plavo:

Boja tripan-plavo	0,08 g
PBS pufer	20,00 mL

0,2% otopina kristal violet:

Boja kristal violet	0,2 g
2% etanol	10,00 mL

3.1.4. Uređaji i oprema

Dyno – Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Taiwan

Hladnjak (4°C i -20°C), Gorenje, Slovenija

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Neubauerova komorica za brojanje stanica, Buffalo, NY, SAD

Svjetlosni mikroskop, Zeiss, Njemačka

Spektrofotometar, Thermo Scientific Genesys 10S UV/VIS, SAD

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Laboratorijsko posuđe (laboratorijske čaše, lijevci, pipete, odmjerne tikvice, menzure, kivete)

Ploče s 6 jažica, Corning, SAD

Ploče s 96 jažica, Corning, SAD

T-boce od 25cm², Corning, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Uzgoj HeLa i HepG2 stanica

Stanice se čuvaju u mediju za zamrzavanje pri -70°C, u ampulama u koncentraciji oko 1x10⁷ st/mL. Odmrzavanje stanica se provodi naglim uranjanjem ampule u vodenu kupelj. Slijedi centrifugiranje suspenzije 3 minute pri 1000 o/min. Nakon centrifugiranja se supernatant ukloni pipetom, a talog se resuspendira u DMEM hranjivom mediju s dodatkom 10% FBS, u odgovarajućim T-bocama. Slijedi uzgoj stanica u inkubatoru pri odgovarajućim uvjetima atmosfere (95% zraka i 5% CO₂) i temperature (37°C). Fiziološko stanje, brojnost i morfologija stanica se provjeravaju pod inverznim mikroskopom. Nakon što pokrivenost površine prijeđe 80%, stanice je potrebno precijepiti kako ne bi došlo do kontaktne inhibicije rasta. Postupak je relativno stresan za adherentne stanice zbog nužne tripsinizacije.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo

U cilju pripreme uzorka za brojanje stanica, stanice je potrebno tripsinizirati kako bi se odvojile od podloge i izdvojile iz nakupina. Hranjivi medij se iz T-boce ukloni pipetom te se doda 1 mL otopine tripsina. Tripsinizacija se brže provodi na višoj temperaturi pa se T-boca stavi u inkubator 3-5 minuta. Učinak tripsinizacije se prati pod inverznim mikroskopom. Odvajanje stanica od podloge je završeno kada se stanice 'zaokruže'.

Djelovanje tripsina se zaustavlja dodatkom 2 mL medija sa serumom (sadrži tripsin inhibitor) čime se stanice resuspendiraju. 20 μ L suspenzije stanica se pomiješa sa 20 μ L boje tripan-plavo. Alikvot od 20 μ L pripremljene otopine se nanosi u Neubauerovu komoricu za brojanje. Komorica je podijeljena na 16 kvadratića ukupne površine 1mm². Broj stanica se računa tako da se srednja vrijednost stanica iz 4 kvadratića pomnoži s 5×10^3 . Princip metode je razlikovanje mrtvih od živih stanica. Velike polarne molekule reagensa djeluju tako što se vežu na unutarstanične proteine. Rezultat je bojenje samo mrtvih stanica zbog oštećenja njihove membrane i posljedičnog propuštanja molekula reagensa. Broj stanica po mL suspenzije određuje se iz izraza:

$$\text{broj stanica/mL suspenzije} = \text{srednja vrijednost broja stanica u 4 kvadratića} \times (5 \times 10^3)$$

3.2.3. Ispitivanje biološke aktivnosti subkritičnog vodenog ekstrakta iz listova imele na HeLa i HepG2 staničnim linijama

Prethodno uzgojene HeLa i HepG2 stanice naciepljene su u ploče sa 96 jažica u početnoj koncentraciji od $2,5 \times 10^4$ st/mL (HeLa) odnosno 5×10^4 st/mL (HepG2). Svaka je jažica naciepljena sa 100 μ L suspenzije stanica. Ploče su stavljene u inkubator s reguliranom atmosferom na temperaturu 37°C. Prihvaćanje stanica za podlogu, njihova morfologija, brojnost i opće stanje praćeni su i kontrolirani inverznim mikroskopom. Nakon 24 sata (od naciepljivanja) stanice su tretirane subkritičnim vodenim ekstraktom imele u volumnim udjelima 1-20% (v/v). U kontrolne jažice HeLa i HepG2 stanica se ne dodaju ekstrakti. Za svaku su koncentraciju uzorka postavljene minimalno tri paralele, a pokus je ponovljen tri puta. Nakon 48 sati od dodatka ekstrakata, određena je vijabilnost stanica MTS metodom te je izražena kao postotak živih u odnosu na kontrolne stanice.

3.2.4. Određivanje vijabilnosti stanica MTS metodom

MTS test je kolorimetrijska metoda za kvantifikaciju živih stanica u ispitivanjima citotoksičnosti tvari. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeva sol)) u obojeni, topljivi formazanski produkt, djelovanjem NAD(P)H-ovisne dehidrogenaze. Nakon tretiranja stanica, u svaku je jažicu dodano 10 μ L MTS reagensa bez prethodnog uklanjanja medija. Stanice su inkubirane tijekom 3 sata pri temperaturi 37°C, 95% vlažnosti zraka i 5% CO₂. Apsorbancija se mjeri na čitaču mikrotitarskih ploča pri 490 nm. Ona je proporcionalna intenzitetu boje koji je proporcionalan broju živih stanica. Vijabilnost se izražava kao apsorbancija tretiranih stanica u odnosu na apsorbanciju kontrolnih (netretiranih) stanica. Srednja vrijednost apsorbancija netretiranih stanica se definira kao 100% preživljenja. Dobiveni se rezultati izraze kao postotak kontrole prema izrazu:

$$\text{Preživljenje (\%)} = \frac{\overline{A_{490}} (\text{tretirane stanice})}{\overline{A_{490}} (\text{kontrolne stanice})} \times 100$$

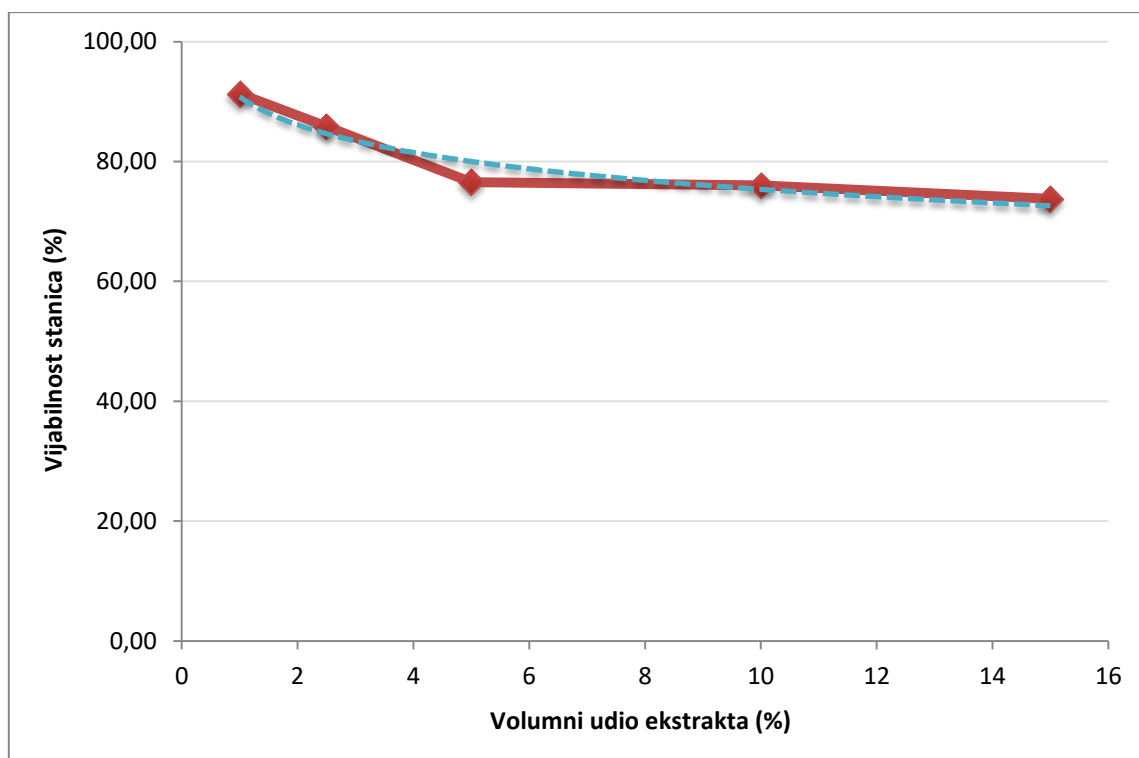
3.2.5. Bojenje stanica bojom kristal violet

Prethodno uzgojene HeLa i HepG2 stanice, održavane u T-bocama, nacijeppljene su u ploču sa 6 jažica u početnoj koncentraciji $2,5 \times 10^4$ (HeLa) odnosno 5×10^4 st/mL (HepG2). U svaku je jažicu nacijeppljeno 2 mL suspenzije stanica tako da su tri jažice nacijeppljene HeLa, a tri HepG2 stanicama. Stanice su uzgajane 24 sata u inkubatoru pri kontroliranim uvjetima atmosfere i temperaturi 37°C, nakon čega su tretirane subkritičnim vodenim ekstraktom imele. Dvije od šest jažica su služile za kontrolu te u njih nisu dodani ekstrakti. U dvije jažice je dodan ekstrakt imele koncentracije 5% (V=100 μ L), dok su u ostale dvije dodani ekstrakti koncentracija 15% (V=300 μ L; HeLa) i 20% (V=400 μ L; HepG2). 48 sati nakon tretmana, uzorci su obojeni otopinom kristal violet i slikani digitalnom kamerom pri povećanju 100x. Prije bojenja je iz jažice uklonjen medij, a stanice su isprane PBS puferom. Zatim je u svaku jažicu dodano 0,5 mL pripremljene otopine boje kristal violet te su stanice inkubirane 10-15 minuta pri temperaturi 37°C. Slijedi uklanjanje boje ispiranjem jažica PBS puferom u obrocima po 1 mL. U svaku se jažicu, nakon ispiranja i prije slikanja stanica, doda 1 mL PBS pufera.

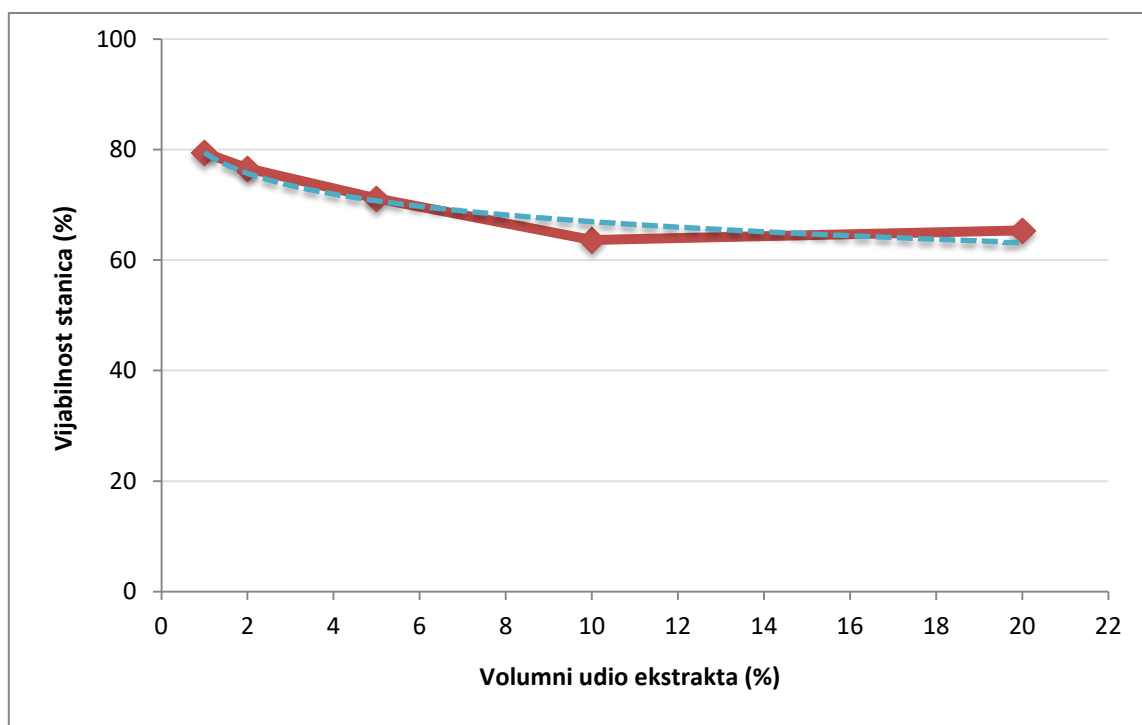
4. REZULTATI

4.1. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta imele na vijabilnost HeLa i HepG2 stanica

HeLa stanice su u mikrotitarsku ploču s 96 jažica nacijepjene u početnoj koncentraciji od $2,5 \times 10^4$ st/mL, dok je početna koncentracija HepG2 stanica bila 5×10^4 st/mL. Razlog tome je brži rast HeLa u odnosu na HepG2 staničnu liniju. Nakon 24-satne inkubacije stanice su tretirane subkritičnim vodenim ekstraktima imele u rasponu koncentracija 0-20% (v/v). Nakon 48 h određena je vijabilnost stanica MTS metodom. Rezultati su izraženi kao graf ovisnosti postotka preživljenja stanica o volumnom udjelu korištenog ekstrakta imele (slike 2 i 3).



Slika 2. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta imele na vijabilnost HeLa stanica



Slika 3. Učinak subkritičnog vodenog ekstrakta imele na vijabilnost HepG2 stanica

Iz dobivenih je rezultata vidljivo da subkritični vodeni ekstrakt imele ima blago inhibitorno djelovanje na rast obje stanične linije. Inhibicija rasta odnosno smanjenje postotka preživljenja stanica je proporcionalna povećanju volumnog udjela ekstrakta.

Minimalna koncentracija ekstrakta kojim su tretirane HeLa stanice iznosi 1% (v/v) te uzrokuje inhibiciju 8,68% populacije. Maksimalna koncentracija ekstrakta kojim su tretirane HeLa stanice iznosi 15% (v/v) te uzrokuje inhibiciju 26,24% populacije.

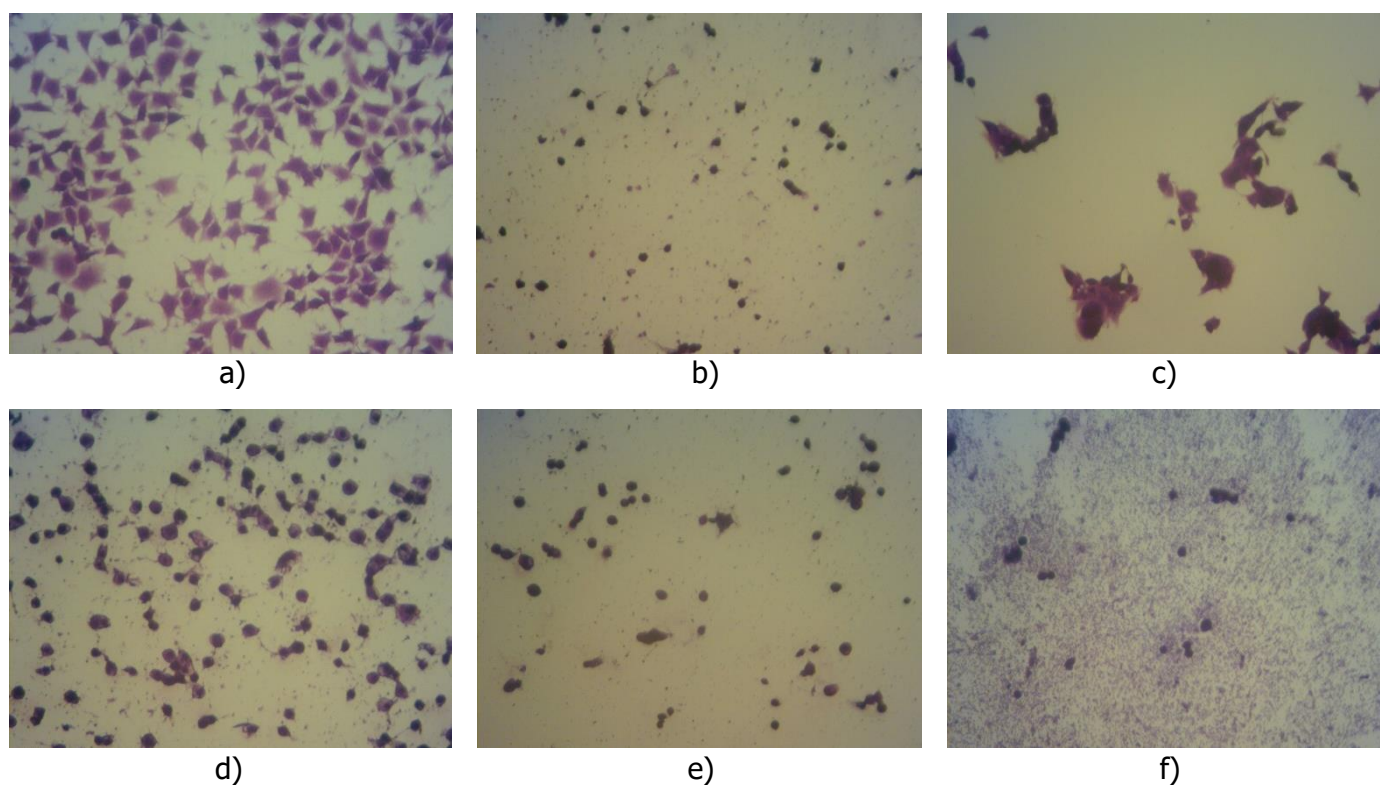
Minimalna koncentracija ekstrakta kojim su tretirane HepG2 stanice iznosi 1% (v/v) te uzrokuje inhibiciju 20,56% populacije. Maksimalna koncentracija ekstrakta kojim su tretirane HepG2 stanice iznosi 20% (v/v) te uzrokuje inhibiciju 34,62% populacije.

Usporedbom rezultata za dvije stanične linije vidljivo je da subkritični vodeni ekstrakt imele ima jače inhibitorno djelovanje na HepG2 u odnosu na HeLa staničnu liniju pri svim ispitivanim koncentracijama.

4.2. Morfološke promjene HeLa i HepG2 stanica nakon tretmana subkritičnim vodenim ekstraktom imele

Rezultati dobiveni MTS metodom potkrijepljeni su proučavanjem morfologije stanica svjetlosnom mikroskopijom nakon bojenja s kristal violet.

Praćene su promjene morfologije ispitivanih staničnih linija tretiranih subkritičnim vodenim ekstraktom imele koncentracije 5%(v/v) i 20 odnosno 15% (v/v), u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.



Slika 4. Morfološki izgled HeLa stanica obojenih otopinom kristal violet: a) kontrolne stanice, b) stanice tretirane 5% ekstraktom imele, c) stanice tretirane 15% ekstraktom imele; Morfološki izgled HepG2 stanica obojenih otopinom kristal violet: d) kontrolne stanice, e) stanice tretirane 5% ekstraktom imele, f) stanice tretirane 20% ekstraktom imele

Na slikama a-c vidljiva je promjena morfologije HeLa stanica tijekom tretmana subkritičnim vodenim ekstraktima imele koncentracija 5%(b) i 15%(c) (v/v). Kontrolne stanice, vidljive na slici a, formiraju pravilni monosloj i karakteristične su morfologije. Na slikama b i c se može opaziti pad gustoće kulture, slabije formiran monosloj te promjena izgleda stanica, što odgovara rezultatima učinka ekstrakata imele na vijabilnost stanica (Slika 2).

Slike d-e prikazuju promjenu morfologije HepG2 stanične linije tretirane subkritičnim vodenim ekstraktima imele koncentracija 5% (e) i 20% (f) (v/v), u odnosu na kontrolne stanice. Uočene su promjene vezane uz razrjeđenje monosloja i smanjenje brojnosti stanica te njihovu karakterističnu morfologiju, a u korelaciji su s rezultatima dobivenim MTS metodom (Slika 3).

5. RASPRAVA

Imela (*Viscum album*) je bogat izvor biološki aktivnih spojeva te ima vrlo široku terapijsku primjenu. Imelu su prvi put u kliničkom liječenju karcinoma primijenili Steiner i Wegman, 20ih godina prošlog stoljeća, a danas su njeni pripravci jedna od najčešćih dopuna klasičnoj terapiji karcinoma (kemo- i radioterapiji). Fitokemikalije kojima se pripisuje antitumorsko djelovanje imele su njeni specifični flavonoidi (kvercetin i derivati), glikoproteini (lektini), polipeptidi (viskotoksini) i peptidi te oligo- i polisaharidi (Bar-Sela, 2011.).

Cilj ovog rada bio je ispitati biološki učinak subkritičnog vodenog ekstrakta imele na rast i proliferaciju HeLa i HepG2 tumorskih staničnih linija. Prethodno uzgojene stanice su nacijepljene u ploče s 96 jažica te uzgajane u inkubatoru tijekom 24 sata, u uvjetima kontrolirane atmosfere i pri temperaturi 37°C. Stanice su zatim tretirane subkritičnim vodenim ekstraktom iz listova imele. HeLa stanice su tretirane ekstraktima imele volumnih udjela 1, 2.5, 5, 10 i 15%, dok su HepG2 stanice tretirane ekstraktima imele volumnih udjela 1, 2, 5, 10 i 20%. 48 sati nakon tretmana, određena je vijabilnost stanica MTS metodom, a dobiveni su rezultati iskazani kao graf ovisnosti vijabilnosti stanica o volumnom udjelu ekstrakta (slike 2 i 3).

Iz dobivenih je rezultata vidljivo da ekstrakt imele inhibira rasti i proliferaciju obje stanične linije. Inhibicija rasta HeLa stanica iznosi 8,68% za najnižu (1% (v/v)) i 26,24% za najvišu (15% (v/v)) ispitivanu koncentraciju ekstrakta imele. Osim toga, iz rezultata je vidljivo da se vijabilnost (preživljenje) stanica ne mijenja značajno pri koncentracijama ekstrakta višim od 5% (v/v). Dakle, može se zaključiti da je upravo pri toj koncentraciji postignut maksimum inhibitornog djelovanja ispitivanog ekstrakta imele na HeLa staničnu liniju. Za maksimalnu inhibiciju rasta i proliferacije stanične linije može se uzeti srednja vrijednost mjerenja pri 5, 10 i 15% (v/v) – 24,55%.

Inhibicija rasta HepG2 stanica iznosi 20,56% za najnižu (1% (v/v)) i 34,62% za najvišu (20% (v/v)) ispitivanu koncentraciju ekstrakta imele. Iz rezultata je vidljivo da se maksimum inhibitornog djelovanja ekstrakta postiže pri koncentraciji 10% (v/v) odnosno da značajna promjena vijabilnosti stanica nije vidljiva pri višim volumnim udjelima ekstrakta imele. Tako se za maksimalnu inhibiciju rasta i proliferacije HepG2 stanične linije može uzeti srednja vrijednost mjerenja pri 10 i 20% (v/v) – 35,48%.

U mnogim je prethodnim istraživanjima ustanovljeno potencijalno antitumorsko djelovanje pripravka *Viscum album* u *in vitro* i *in vivo* sustavima.

U istraživanju utjecaja pripravka imele na cito- i genotoksično djelovanje MTX-a, korištene su stanice koštane srži zdravih laboratorijskih miševa. Metotreksat (MTX; eng. *Methotrexate*) je antineoplastični agens koji djeluje kao antimetabolit (anti-folna kiselina) i imunosupresiv. Izaziva inhibiciju sinteze DNA, RNA i proteina pa se koristi u liječenju karcinoma. MTX ograničava sintezu timidilata i purinskih nukleotida što uzrokuje neravnotežu raspoložive količine nukleotida te često rezultira mutagenезom i/ili smrću (zdrave) stanice. Stanice koštane srži miševa tretiranih s MTX su pokazale znatni pad vrijednosti mitotičkog indeksa (MI) i porast broja kromosomskih aberacija (CA), u odnosu na kontrolu. Stanice uzete iz miševa tretiranih ekstraktom imele nisu pokazale značajne promjene MI i CA. No, stanice uzete iz miševa tretiranih kombinacijom MTX i ekstrakta imele, imale su znatno viši MI i niži CA u odnosu na grupu tretiranu samo s MTX (Şekeroğlu i Şekeroğlu, 2012.).

U drugom je istraživanju ispitivana antitumorska aktivnost pripravka imele *Isorel M* (ekstrakt *Viscum album* s drva jabuke) na laboratorijskim miševima oboljelima od CMC-2 fibrosarkoma. Ispitivanje djelovanja pripravka provedeno je samostalno i u kombinaciji s lokalnom terapijom X-zrakama. U prvom slučaju – samostalno korištenje pripravka imele – nisu zamijećene promjene u stanju laboratorijskih miševa. No, kombinacija *Isorel M* pripravka i klasične terapije X-zrakama, rezultirala je značajnim porastom preživljenja u odnosu na miševe tretirane samo X-zrakama (Zarkovic i sur., 2001.).

Ova ispitivanja pokazuju da se ne može zaključiti o antitumorskom djelovanju pripravaka imele ako se oni koriste kao samostalna terapija. No, obzirom na sadržaj fitokemikalija, može se pretpostaviti o mehanizmu njenog djelovanja kao komplementarne terapije. Tako bi na primjer citotoksični i imunomodulatorni utjecaj lektina i viskotoksina, mogao biti izraženiji kod tumorskih stanica prethodno oslabljenih odgovarajućom kemo- ili radioterapijom. S druge strane, imelini flavonoidi smanjuju razinu oksidativnog stresa, što može povećati proliferaciju zdravih stanica i potencijalno spriječiti širenje tumora.

U radu je promatran i utjecaj ekstrakta imele na morfologiju staničnih linija. Stanice su nacijepljene u ploče sa 6 jažica te uzgajane u inkubatoru tijekom 24 sata. Nakon uzgoja su tretirane odabranim koncentracijama ekstrakta imele – 5 i 15% (v/v) za HeLa te 5 i 20% (v/v) za HepG2 staničnu liniju – tijekom 48 sati. Zatim je u jažice dodana otopina boje kristal violet pa su stanice slikane pod inverznim mikroskopom na povećanju 100x. Kod kontrolnih je stanica uočen pravilan monosloj te karakteristična morfologija, dok je kod tretiranih

stanica primijećena smežuranost i manji broj stanica, što je u korelaciji s rezultatima dobivenim MTS metodom.

Iz provedenog se istraživanja može zaključiti da subkritični vodeni ekstrakt iz listova imele ima blago inhibitorno djelovanje na rast i proliferaciju obje stanične linije. Za utvrđivanje potencijalnog antitumorskog djelovanja ekstrakta imele, potrebno je ovakvu vrstu istraživanja primijeniti i na druge stanične linije, a poželjno i u kombinaciji s klasičnim metodama liječenja karcinoma . Ipak, potpuna slika o učinku ekstrakta imele može se dobiti tek nakon provedbe *in vivo* testova, uz nužnu detaljnu usporedbu dobivenih rezultata s prethodno provedenim istraživanjima.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih pokusa i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta imele u rasponu koncentracija 1-15% (v/v) pokazuje inhibitorni učinak na rast i proliferaciju HeLa stanica, pri svim ispitivanim koncentracijama. Minimum inhibicije je 8,68%, a maksimum 24,55%.
2. Dodatak subkritičnog vodenog ekstrakta imele u rasponu koncentracija 1-20% (v/v) pokazuje inhibitorni učinak na rast i proliferaciju HepG2 stanica, pri svim ispitivanim koncentracijama. Minimum inhibicije je 20,56%, a maksimum 35,48%.
3. Subkritični vodeni ekstrakt imele je uzrokovao morfološke promjene u obje stanične linije, što odgovara rezultatima dobivenim MTS metodom.

7. LITERATURA

Batra, P., Sharma A.K. (2013) Anti-cancer potential of flavonoids: recent trends and future perspectives. *3 Biotech* **3**, 439-459.

Boyd, M.R., Paull, K.D. (1995) Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen. *Drug Development Research* **34**, 91-109.

Brito, A.F., Ribeiro, M., Abrantes, A.M., Pires, A.S., Teixo, R.J., Tralhão, J.G., Botelho, M.F. (2015) Quercetin in Cancer Treatment, Alone or in Combination with Conventional Therapeutics? *Current Medicinal Chemistry* **22**, 3025-3039.

Butler, M. (2004) *Animal Cell Culture and Technology*, 2. izdanje, Garland Science/Bios Scientific Publishers, New York.

Butler, M., Christie A. (1994.), Adaptation of mammalian cells to non-ammoniogenic media. *Cytotechnology* **15**, 87-94.

Castilho, L.R., Moraes, A.M., Augusto, E.F.P., Butler, M. (2008) *Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy*, Taylor & Francis, New York.

Dehn, P.F., White, C.M., Conners, D.E., Shipkey, G., Cumbo, T.A. (2004) Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an *in vitro* model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* **40**, 172-182.

Freshney, I.R. (2010) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 6. izdanje, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Gartler, S.M. (1968) Apparent HeLa cell contamination of human heteroploid cell lines. *Nature* **217**, 750-751.

Gerets, H.H., Tilmant, K., Gerin, B., Chanteux, H., Deplechin, B.O., Dhalluin, S., Atienzar, F.A. (2012) Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology* **28**, 69-87.

Gey, G.O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* **12**, 264–265.

Hajtó, T., Hostanska, K., Berki, T., Pálinkás, L., Boldizsár, F., Németh, P. (2005) Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from *In vitro* Experiments and *In vivo* Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2**, 59-67.

Hassell, T., Gleave, S., Butler, M. (1991) Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **30**, 29-41.

Jeong, J.H., An, J.Y., Kwon, Y.T., Rhee, J.G., Lee, Y.J. (2009) Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry* **106**, 73-82.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **56**, 195-204.

Lam, S.K., Ng, T.B (2011) Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**, 45–55.

Landry, J.J.M., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M., Stütz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J.O., Huber, W., Steinmetz, L.M. (2013) The Genomic and Transcriptomic Landscape of HeLa Cell Line. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **3**, 1213-1224.

Lev, E., Ephraim, M., Ben-Arye, E. (2011) European and Oriental mistletoe: From mythology to contemporary integrative cancer care. *European Journal of Integrative Medicine* **3**, 133-137.

- Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M., Li, H.B. (2014) Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients* **6**, 6020-6047.
- Liang, X., Fan, Q. (2013) Application of sub-critical water extraction in pharmaceutical industry. *Journal of Material Science and Chemical Engineering* **1**, 1-6.
- Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein I.J (1986) The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine, Academic Press INC., Orlando, Florida.
- Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B.M., Zimonjic, D., Popescu, N., Ried, T. (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Research* **59**, 141–150.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009), Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**, 270–278.
- Popescu, N.C., DiPaolo, J.A., Amsbaugh, S.C. (1987) Integration sites of human papillomavirus 18 DNA sequences on HeLa cell chromosomes. *Cytogenetics and Cell genetics* **44**, 58-62.
- Puck, T.T., Marcus, P.I. (1955) A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of x-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **41**, 432-437.
- Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., Gaurina Srček, V., Radošević, K. (2016) Primjena kultura stanica za određivanje biološke aktivnosti spojeva iz biljaka. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **11**, 169-175.
- Rovio, S., Hartonen, K., Holm, Y., Hiltunen, R., Riekkola, M.L. (1999) Extraction of Clove Using Pressurized Hot Water, *Flavour and Fragrance Journal* **14**, 399-404.
- Sahi, J., Grepper, S., Smith, C. (2010) Hepatocytes as a tool in drug metabolism, transport and safety evaluations in drug discovery. *Current Drug Discovery Teyhnologies* **7**, 188-198.

Sassa, S., Sugita, O., Galbraith, R.A., Kappas, A. (1987) Drug metabolism by the human hepatoma cell, HepG2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **143**, 52-57.

Schaller G., Urech K., Giannattasio M. (1996) Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the European subspecies *Viscum album* L. *Phytotherapy Research* **10**, 473–477.

Scherer, W.F., Syverton, J.T., Gey, G.O. (1953) Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *The Journal of Experimental Medicine* **97**, 695–710.

Şekeroğlu, Z.A., Vedat Şekeroğlu, V. (2012) Effects of *Viscum album* L. extract and quercetin on methotrexate-induced cyto-genotoxicity in mouse bone-marrow cells. *Mutation Research* **746**, 56-59.

Zarkovic, N., Vukovic, T., Loncaric, I., Miletic, M., Zarkovic, K., Borovic, S., Cipak, A., Sabolovic, S., Konitzer, M., Mang, S. (2001) An overview on anticancer activities of the *Viscum album* extract Isorel. *Cancer Biother Radiopharm* **16**,55–62.

Zuber, D. (2004) Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* **199**, 181-203.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Vukobratović